



<原著>Porphyromonas gingivalis, E.coilおよびLPSによる新しいリンパ球群の誘導

著者	杉浦 慶太郎
雑誌名	東北大学歯学雑誌
巻	13
号	1
ページ	37-50
発行年	1994-06-30
URL	http://hdl.handle.net/10097/31468

原 著

Porphyromonas gingivalis, *E. coli* および LPS による 新しいリンパ球群の誘導

杉浦 慶太郎

東北大学歯学部口腔細菌学講座

(指導: 熊谷勝男教授)

(平成6年1月6日受付, 平成6年5月9日受理)

Induction of novel lymphocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis*, *E. coli* and LPS

Keitaro Sugiura

Department of Oral microbiology,

Tohoku University School of Dentistry

(Director : Prof. Katsuo Kumagai)

Abstract : To investigate the pathogenic roles of gram-negative rods in oral and periodontal tissues, sonicates of *Porphyromonas gingivalis* were injected venously in mice. At least 24 hrs later, the surface markers of lymphoid cells isolated from the liver, spleen, and peripheral blood were examined by immunofluorescence with monoclonal antibodies against CD3, NK1.1, and other antigens expressed on murine lymphoid cells. A specific increase in the percentages of cells positive intermediately for CD3 and highly for NK1.1 (CD3^{int} NK1.1^H) was identified as a new population of lymphoid cells, which has never been reported before.

This population of CD3^{int} NK1.1^H could also be induced by injection of *Escherichia coli* sonicates and the lipopolysaccharide fraction isolated from *E. coli*. Furthermore, the same lymphoid cell population was induced in the liver of mice treated with a new cytokine, interleukin 12 (IL-12), which was specifically induced in mice by LPS. These CD3^{int} NK1.1^H populations induced by *P. gingivalis*, *E. coli*, LPS, and IL-12 share a quite similar profile of lymphoid cell markers (CD3^{int}, NK1.1^H, CD4⁺, CD8⁻, V β 8⁺), which was also found in T_{NK} cells, an intermediate population between T cells and NK cells.

In conclusion, when injected in mice, oral gram-negative bacteria induced a lymphoid population in the liver. These cells may be an activated cell population of precursor cells, which might belong to the extrathymically generating lymphoid cell population T_{NK}.

Key words : CD3^{int} NK1.1^H, T_{NK}, interleukin 12 (IL-12), *Porphyromonas gingivalis*, LPS

緒 言

口腔は歯、口腔粘膜、顎骨組織およびその周囲軟組織など解剖学的に多彩な構成組織から成り、微生物にとっても複雑な環境条件を提供している。従って他の体表組織に比べ、口腔組織では微生物侵襲、とくに、細菌に由来する炎症の発生頻度が著しく高い。口腔組織感染症の多くは、口腔内常在菌によって起こるとされている¹⁾が、その発生機序は、必ずしも単純ではなく、局所や全身の感染抵抗性が関与する、一種の内因性疾患の要素も含んでいる。つまり、通常無害である常在菌が生体の全身的、局所的抵抗性の低下によって口腔内組織に侵入して増殖し、病原性を発揮するのである。このような常在菌による発炎が頻発する口腔内組織の代表は歯周ポケット内壁である。そしてここでの炎症の多くは慢性化する。この慢性化した炎症をもつポケット内で病原性を発揮している代表的常在細菌は、*Porphyromonas* 属や *Fusobacterium* 属を含むグラム陰性偏性嫌気性桿菌である。²⁾そして、これらのグラム陰性桿菌の病原因子の代表はその細胞壁を構成するリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) であることがよく知られている³⁾。

LPS は内毒素として知られる生物活性をもつ。つまり、LPS は炎症局所では、直接体液中の補体を活性化し、多くの免疫担当細胞、とくに、マクロファージに働いて、その活性化を促し、これらの細胞からの tumor necrosis factor (TNF) や interleukin-1 (IL-1)⁴⁾などのサイトカインの産生を誘導する。従って、LPS はこのようなメディエーター介在の下に、免疫系を刺激することとなるが、一方で、これらのメディエーターは歯周軟組織や骨の萎縮や肥厚を促す発炎症因子としても働く⁵⁾。さらには、産生したメディエーターが全身的に作用すると、発熱や内毒素ショックを起こし、激しいときは致死性に働く。

LPS は炎症局所では組織脈管に作用し、多くの血液細胞、とくに、多形核白血球の遊走と炎症組織への浸潤を促す。浸潤した多形核白血球は一方で、食作用によって感染組織からの細菌の除去に働くとともに、他方では組織の障害因子として働く。

筆者らのグループは、種々の細菌の各種免疫担当細胞の分化、増殖に対する作用を研究中に、種々の細菌々体成分をマウスに投与すると、多形核白血球の浸潤のみではなく、リンパ球、とくに、NK 細胞やある種の T 細胞 ($\gamma\delta$ T 細胞) の増殖やその活性化が起こることを

知った。その後、筆者は、この作用は特にグラム陰性桿菌に強いことに気づき、これらのグラム陰性桿菌には多形核白血球だけではなく、リンパ球系統の細胞の誘導をも促す菌体成分が存在することを想定した。このことは、歯周組織では多形核白血球の浸潤の他に、多くのリンパ球様細胞が見られること、とくに、炎症が慢性化した組織内にはリンパ球や NK 細胞の増加が認められることから明らかである⁶⁾。さらに、グラム陰性桿菌に由来する LPS には NK 細胞を活性化する作用のあることも報告されている⁷⁻¹⁰⁾。このように、グラム陰性桿菌にリンパ球 (T 細胞や NK 細胞) の増殖、活性化を刺激する因子が存在し、口腔内感染などで、その防御や慢性化に関与する、重要な機構の存在することが示されている。

以上のような背景の下に、筆者は、グラム陰性桿菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *E. coli*) のマウスへの投与によって起こるリンパ球の誘導現象を解析し、新知見を得たのでその成績を報告する。

材料と方法

1. 実験動物

C57BL/6 6-8 週齢の雄性マウスを船橋農場より購入し、東北大学医学部附属動物実験施設にて、SPF (specific pathogen free) 環境下で飼育し使用した。

2. 細菌の培養、菌体成分の調整

用いた細菌は、グラム陰性偏性嫌気性桿菌の *Porphyromonas gingivalis* とグラム陰性通性嫌気性桿菌の *E. coli* である。*Porphyromonas gingivalis* は、GAM ブイヨン培地 (日水製薬株式会社) にて 37°C, 48 時間、嫌気培養し、*E. coli* は、THB 培地 (OXOID) にて 37°C, 24 時間、振盪培養することにより、飽和状態の菌液を得た。飽和状態の菌液にホルマリンを 0.3% 添加して殺菌し、3,000 r.p.m., 20 分で遠心し、菌のペレットを得た。菌ペレットを脱 Ca^{2+} , Mg^{2+} リン酸緩衝液 (PBS (-), 0.01 M, pH 7.2) にて 3 度洗浄した後、3 ml 量の菌体を取り、Handy Sonic (株式会社トミー精工) を用いて超音波処理を行い、菌体を破壊した。破壊した菌体を PBS にて 10 ml に希釈し、菌体成分液として用いた。

3. 菌体成分, LPS, サイトカインの投与量及び投与法

菌体成分液は、マウス 1 匹あたり 0.1 ml 尾静脈より静脈内投与を行なった。また、精製 LPS (*E. coli* LPS026: B6, Difco) は 2.5 μ g, hTNF- α (大日本製薬株式会社) は 1×10^4 U, hIL-2 (塩野義製薬株式会社) は 1×10^4 U, mIL-12 (Genetics Institute, Inc. U.S.A. 研究員小林路子博士より分与されたものを使用) は 0.5 μ g, mIFN- γ (塩野義製薬株式会社) は 1×10^4 U をマウス 1 匹あたりそれぞれ腹腔内投与した。

4. 細胞調整

エーテル麻酔下でマウスの腋窩動静脈を切断して脱血死させた後、各々の臓器を摘出した。末梢血はヘパリン加シリンジで採血後、PBS で 5 倍希釈し Ficoll-Isopaque 比重遠心法により分離した単核球を用いた。肝臓はあらかじめ、PBS にて灌流を行って末梢血を除去の後、摘出した。摘出肝をハサミで細切後、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし 10% FCS 加 RPMI1640 培地 (日水製薬株式会社) にて 1,800 r.p.m., 10 分, 4°C の条件で 2 度洗浄した。次いで同培地で 30% に調整した Percoll 液 (Pharmacia Biotech 株式会社) に細胞を再浮遊させ 2,300 r.p.m., 15 分, 室温で遠心して、肝実質と分離したものを、Lysing Buffer (0.75% 塩化アンモニウム, 0.21% トリス液 pH 7.65) にて赤血球を除去して用いた。脾臓はハサミで細切後、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし、1,500 r.p.m., 5 分遠心後、ペレットに Lysing Buffer を加え、赤血球を除いて用いた。胸腺は摘出したものを、200 ゲージのステンレスメッシュですりつぶし、10% FCS 加 RPMI1640 培地にて 1,500 r.p.m., 5 分遠心により洗浄して用いた。

5. 免疫蛍光染色

細胞表面抗原の同定はモノクローナル抗体を用いた二重染色により行った。モノクローナル抗体は、Fluorescein isothiocyanate (FITC) または Phycoerythrin (PE) 標識したものをを用いた。使用した抗体は、抗マウス CD3, NK1.1 (PharMingen Co San Diego, CA), CD4, CD8 (Becton Dickinson Immunocytometry), 抗マウス V β 8 (F23.1) (順天堂大学医学部免疫学講座加藤和則博士より分与されたものを使用) である。蛍光染色細胞は FACScan (Becton Dickinson & Co.

Ltd, Mountain View, CA) にて解析した。

6. 細胞障害試験

標的細胞として用意したナチュラルキラー (NK) 感受性のマウスリンパ球系細胞株 YAC-1 細胞 2×10^6 個を $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 液 (1 mCi/ml) 0.2 ml に浮遊させ、37°C で 1 時間炭酸ガス培養器にて培養の後 10% FCS 加 RPMI1640 培地で 2 回洗浄して標的細胞として用いた。菌体成分やサイトカインで刺激したマウスの肝臓と脾臓の単核球の細胞を 4 段階に希釈してマイクロプレートに 100 μ l ずつ各 well に加えた後、ラベルした標的細胞液を 100 μ l ずつ加え 4 時間の ^{51}Cr 遊離法にて障害活性を測定した。

結 果

1. 菌体成分の投与による NK 様細胞の誘導

Porphyromonas gingivalis 菌体成分を静脈内投与し、12 時間後に肝臓、脾臓、胸腺、末梢血を採取し、それぞれの単核球における T 細胞マーカーである CD3 と NK 細胞マーカーの NK1.1 の発現パターンを二重染色により FACS で解析した。図 1 に示される様に、コントロールマウスでは、肝臓のみに CD3 intermediate, NK1.1 dull positive (図 1 の \downarrow) の細胞群が認められた。*Porphyromonas* 菌体成分投与マウスでは、全臓器で CD3 bright positive (CD3^{H}) 細胞である胸腺由来 T 細胞 (図 1 の $\downarrow\downarrow\downarrow$) の等高線が減少しており、この細胞が減少していることが確認された。肝臓においては、NK1.1 のみ陽性 ($\text{CD3}^{\text{H}}\text{-NK1.1}^+$) である NK 細胞の増加、そして CD3 intermediate, NK1.1 high の細胞群 (図 1 の $\downarrow\downarrow$) ($\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞と略称) の出現が認められた。脾でもわずかながら $\text{CD3}^{\text{H}}\text{-NK1.1}^+$ の NK 細胞の増加が認められたが、 $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ の出現は認められなかった。また、末梢血では、 $\text{CD3}^{\text{H}}\text{-NK1.1}^+$ の NK 細胞の増加と、若干の $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ の出現 (図 1 の $\downarrow\downarrow$) が認められた。このことから、*Porphyromonas gingivalis* の菌体成分の投与は、肝と末梢血で検出される $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ という新しい細胞群を特異的に誘導することが示された。

2. *E. coli* 菌体成分と *E. coli* 由来 LPS の投与による $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ の誘導

Porphyromonas gingivalis 菌体成分に次いで、*E. coli* 菌体成分の投与による肝と脾のリンパ球の変化を

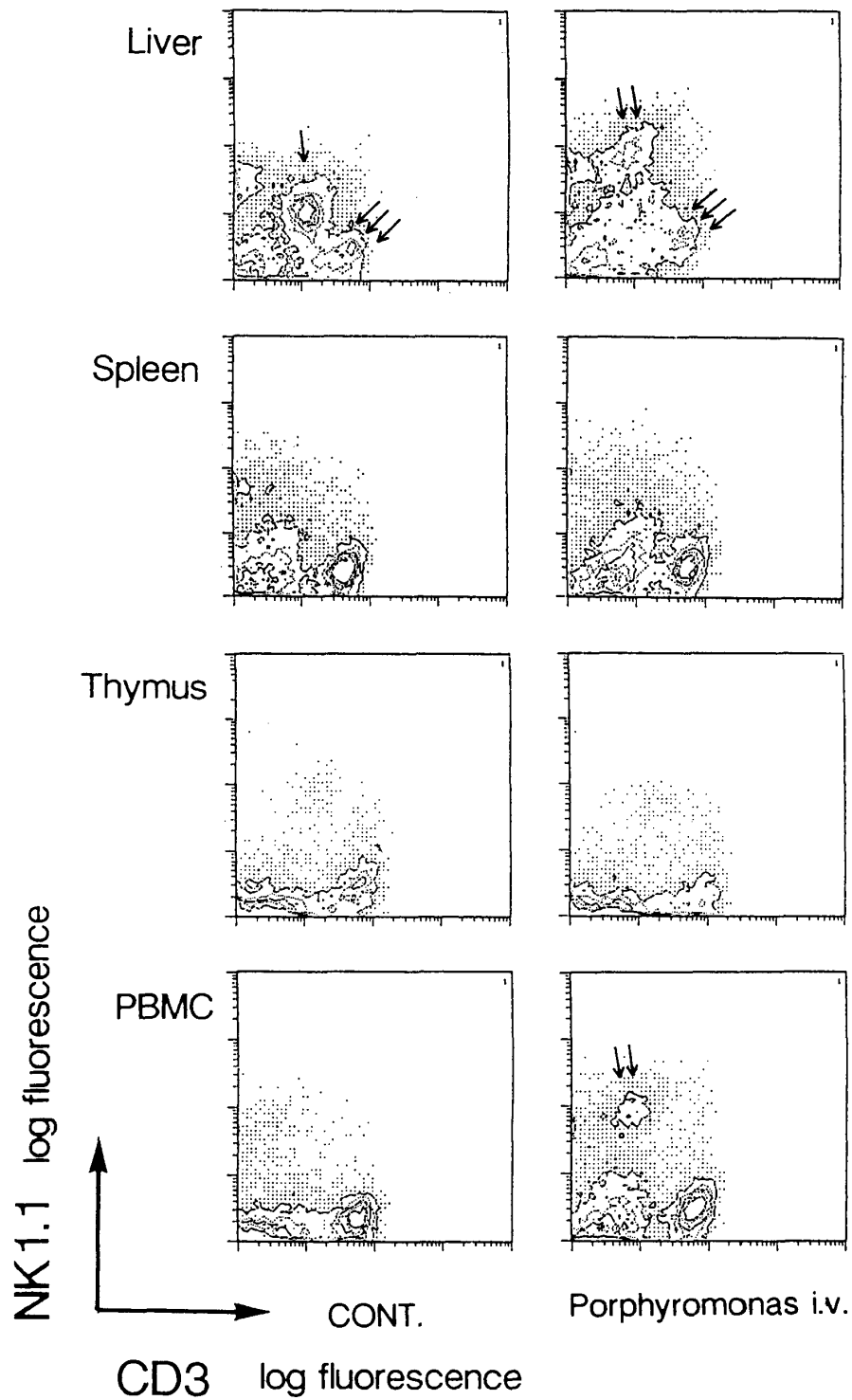


図1 *Porphyromonas gingivalis* 菌体成分投与による各免疫臓器でのリンパ球の変化
Porphyromonas gingivalis 菌体成分を 100 μ l 静脈内投与後 12 時間後のマウスと正常マウスの肝臓, 脾臓, 胸腺, 末梢血の CD3 (FITC) と NK1.1 (PE) の二重染色のパターン。(↓) は TNK 細胞, (↓↓) は CD3^{int} NK1.1^H 細胞, (↓↓↓) は胸腺内分化 T 細胞である。

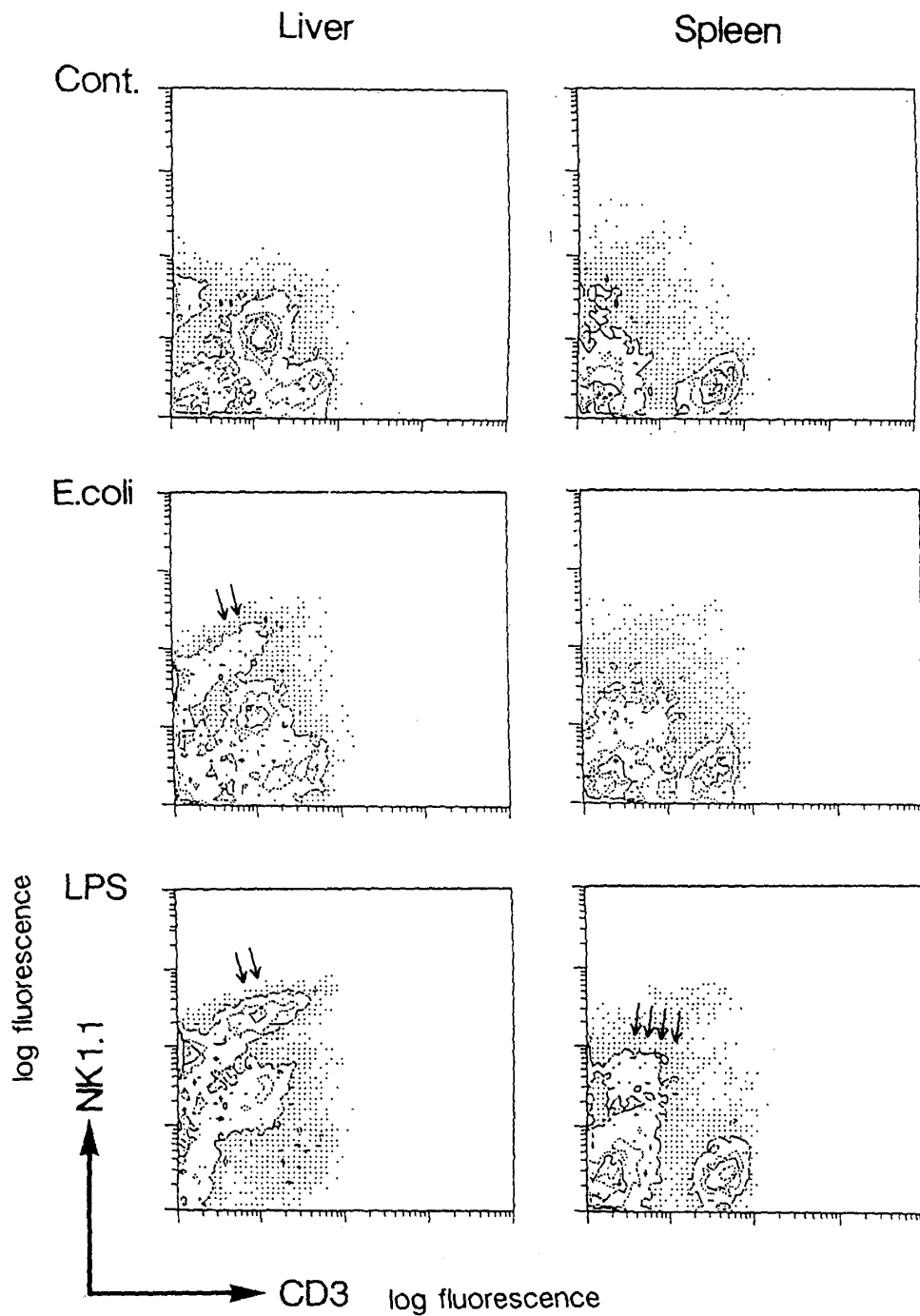


図2 *E. coli* 菌体成分投与, LPS 投与による肝臓, 脾臓でのリンパ球の変化
E. coli 菌体成分を 100 μ l 静脈内投与, LPS を 2.5 μ g 腹腔内投与後 12 時間の肝臓, 脾臓の CD3 (FITC) と NK1.1 (PE) の二重染色のパターン。(↓↓) は CD3^{int}NK1.1^H 細胞で, (↓↓↓↓) は NK 細胞である。

追跡した (図2)。結果は, *E. coli* でも肝臓において, CD3^{int}NK1.1^H の細胞の誘導が認められた (図2の↓↓)。この両グラム陰性桿菌共通の構成成分として, LPS を想定し, *E. coli* 由来 LPS をマウスに投与し, 肝と脾でのリンパ球マーカーの変化を調べた。その結果,

図2に示されるように, LPS 投与では, *Porphyromonas*, *E. coli* 投与時と同様に, CD3^{int}NK1.1^H 細胞の誘導が肝において認められた (図2の↓↓)。一方, 脾では CD3-NK1.1⁺ の NK 細胞 (図2の↓↓↓↓) の増加が認められた。このことから, *Porphyromonas*

gingivalis の投与により肝で見られた $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の出現と脾での NK 細胞の増加は、グラム陰性菌の細胞壁構成因子の一つである LPS の作用によるものであることが示唆された。

3. $TNF-\alpha$ の投与による $CD3$, $NK1.1$ の変化

LPS の投与により生体内には、マクロファージなどの刺激にもとづくサイトカインが誘導される、その代表の一つは、 $TNF-\alpha$ である。産生 TNF には NK 細胞

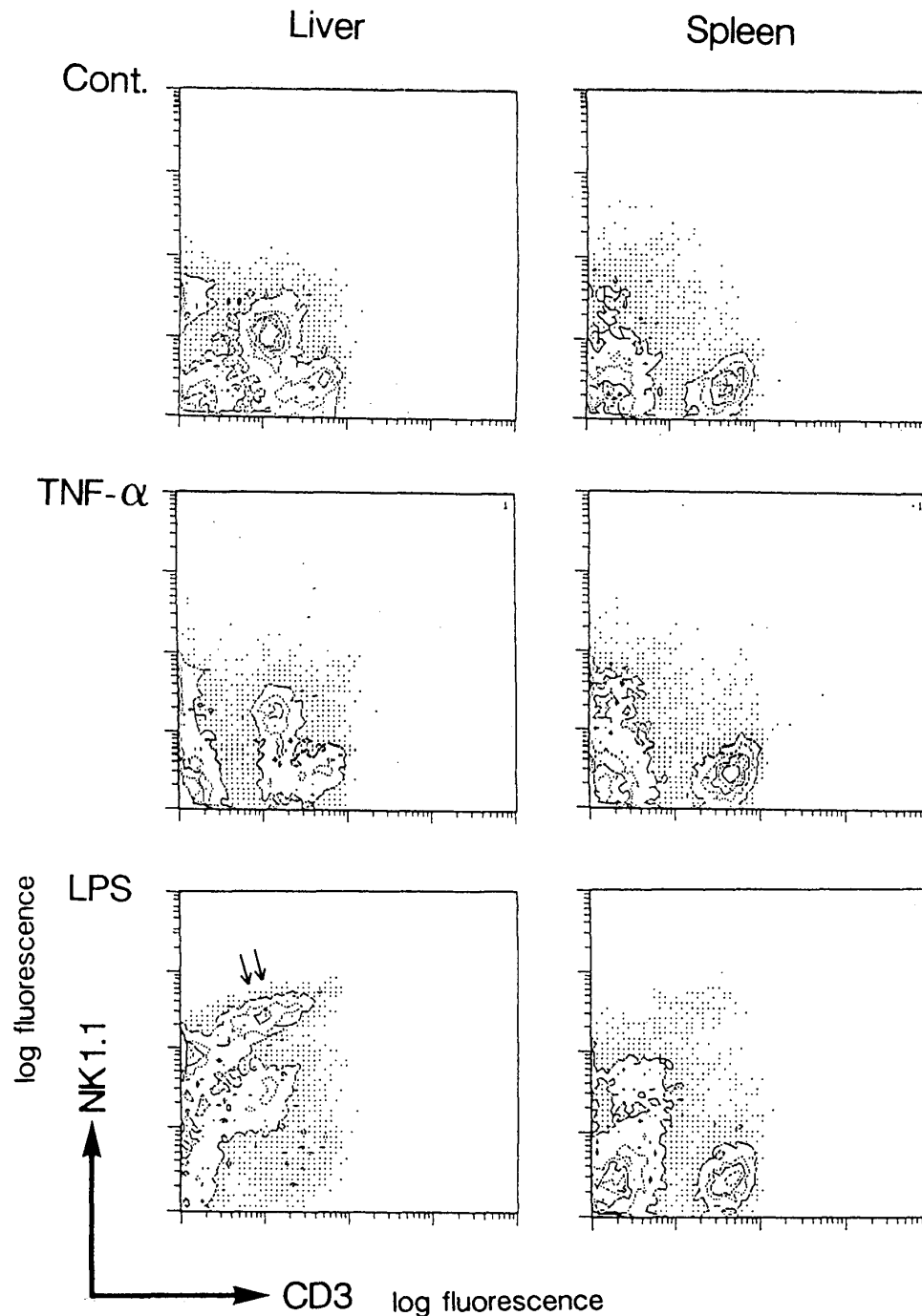


図3 LPS 投与, hTNF- α の投与による肝臓, 脾臓でのリンパ球の変化
LPS を $2.5 \mu g$, hTNF- α を 1×10^4 U 腹腔内投与後 12 時間の肝臓, 脾臓の $CD3$ (FITC) と $NK1.1$ (PE) の二重染色のパターン。(↓↓) は $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞である。

などの細胞障害活性の刺激がよく知られている⁷⁾。そこで、 $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞は、LPS 投与によって産生誘導された TNF などの作用によるものであるか否かを検討するために、レコンビナント TNF- α を投与したマウスの肝でのリンパ球マーカーの変動を調べた。図 3 に示すように、LPS 投与で認められた $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞 (図 3 の ↓ ↓) の出現は TNF- α の投与では肝でも脾でも全く認められなかった。一方、TNF- α の投与は脾における NK 細胞の若干の増加を誘導した。

4. LPS, TNF- α 投与による細胞障害活性試験

LPS の投与によって、肝で $CD3^{int}NK1.1^H$ が誘導され、脾で NK 細胞の増加が見られたことから、肝および脾での細胞障害活性が増強することが推察される。そこで、LPS 投与マウスの肝と脾の単核球の細胞障害活性を測定した。同様の細胞障害活性測定を TNF- α 投与マウスの肝と脾でも行った (図 4)。実験には、NK 感受性である YAC-1 細胞を標的細胞として用い、⁵¹Cr の遊離を測定することにより、細胞障害活性を解析した。肝では、LPS 投与群で著しい細胞障害活性の増強が得られたが、TNF- α 投与群では、LPS 投与群ほ

どにはその上昇は認められなかった。脾においても、TNF- α 投与群は LPS 投与群ほどの細胞障害活性の上昇は示さなかった。また、脾での活性は肝に比べてはるかに低いものであり、 $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の出現と、細胞障害活性の上昇が強く相関した。この結果および 3. の結果より、LPS による $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の出現と細胞障害活性の増強作用は、LPS によって誘導された TNF- α にもとづくものではなく、他の何らかの因子に由来している可能性を示唆するものである。

5. IL-12 投与による $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の変化

LPS の投与によって B 細胞からの産生が誘導されることが最近報告されているサイトカインに interleukin12 (IL-12) がある³⁰⁾。IL-12 は、また、NK 細胞の活性化因子として著名である¹¹⁻¹⁷⁾。従って、LPS による $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の出現にこの IL-12 の関与が考えられるので、マウスのレコンビナント IL-12 をマウスに投与し、肝と脾でのリンパ球マーカーの解析を試みた (図 5)。結果は予想したように、IL-12 投与群では LPS 投与群と同様に肝において $CD3^{int}NK1.1^H$ 細胞の発現が明瞭に認められた (図 5 の ↓ ↓)。これに

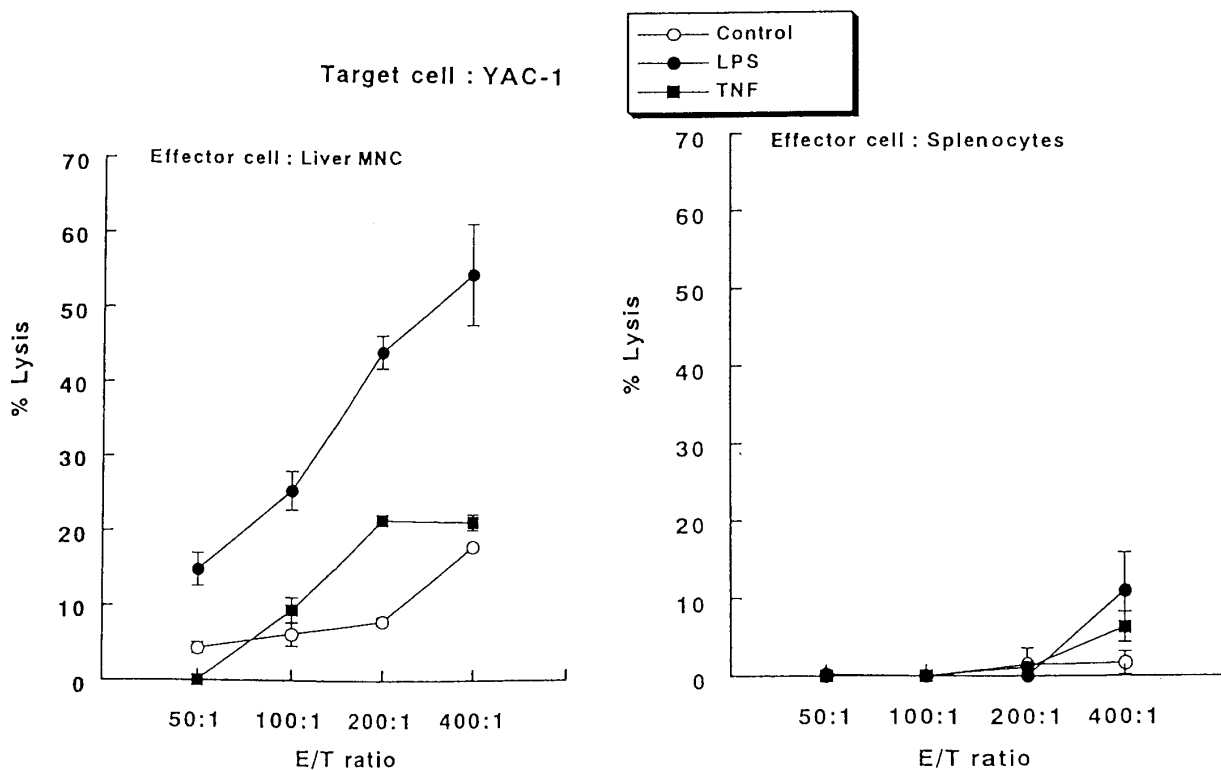


図 4 LPS 投与、hTNF- α 投与での肝臓、脾臓での細胞障害活性試験
LPS を $2.5 \mu g$, hTNF- α を 1×10^4 U 腹腔内投与後 12 時間の肝臓、脾臓の細胞障害活性試験。
YAC-1 細胞を Target として用い、4 時間の ⁵¹Cr 遊離法にて障害活性を測定した。

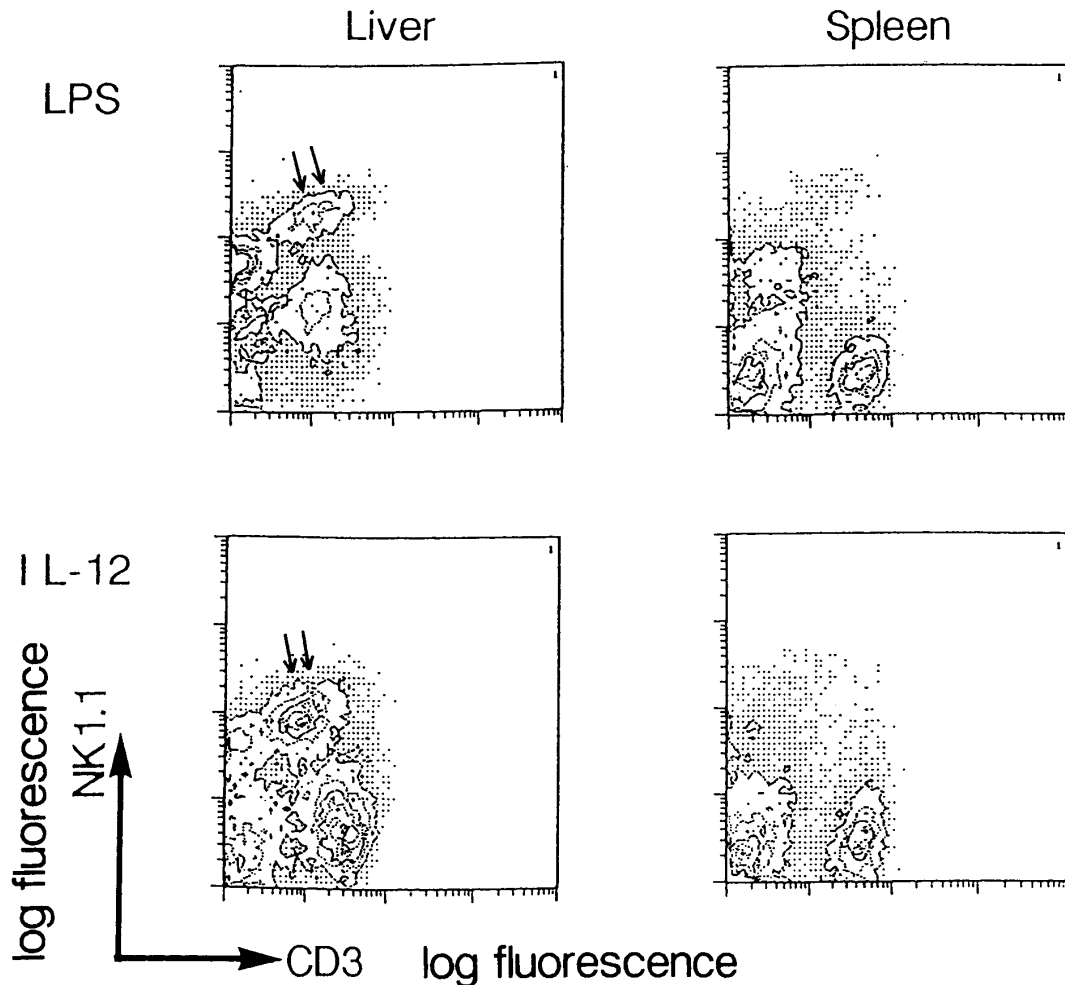


図5 LPS投与, mIL-12投与による肝臓, 脾臓でのリンパ球の変化
LPSを2.5 μ g, mIL-12を0.5 μ g腹腔内投与後12時間の肝臓, 脾臓のCD3 (FITC) とNK1.1 (PE) の二重染色のパターン。(↓ ↓)はCD3^{int}NK1.1^h細胞である。

より, LPS投与によるこの細胞群の出現に, IL-12を介する経路が関与する可能性が強く示唆された。

6. IFN- γ の投与によるCD3^{int}NK1.1^h細胞の変化

IL-12の生物活性の一つとして, NK細胞を活性化し, IFN- γ の産生を誘導することが知られている¹¹⁻¹⁵⁾。従って, IL-12によるCD3^{int}NK1.1^h細胞の誘導に, IL-12によるIFN- γ の産生が関与している可能性が強く示唆される。そこで, その可能性を検討するため, IFN- γ と, その作用を増強するIL-2との併用投与を行い, それにより出現してくる細胞の表面マーカーの解析を行なった。図6に示すように, 予想に反し, IFN- γ , IL-2との併用投与ではCD3-NK1.1⁺のNK細胞の増加はあったものの, IL-12投与時に見ら

れたCD3^{int}NK1.1^hの出現は認められなかった。

7. IFN- γ とIL-2併用投与による細胞障害活性試験

前項と同様に, IFN- γ とIL-2を併用投与して, 肝と脾の細胞障害活性の変動を観察した。その結果, IFN- γ とIL-2の併用投与で, 脾においては, IL-12投与群より若干強い細胞障害活性の増強が認められたが, 肝での細胞障害活性の増強は認められなかった。この結果と前項の結果から, IL-12による肝でのCD3^{int}NK1.1^h細胞の出現と, 細胞障害活性の増強はIL-12により産生誘導されたIFN- γ の作用ではなく, 肝での特異的なIL-12による直接作用か, 他の因子を経由する間接作用によることが強く示唆された。

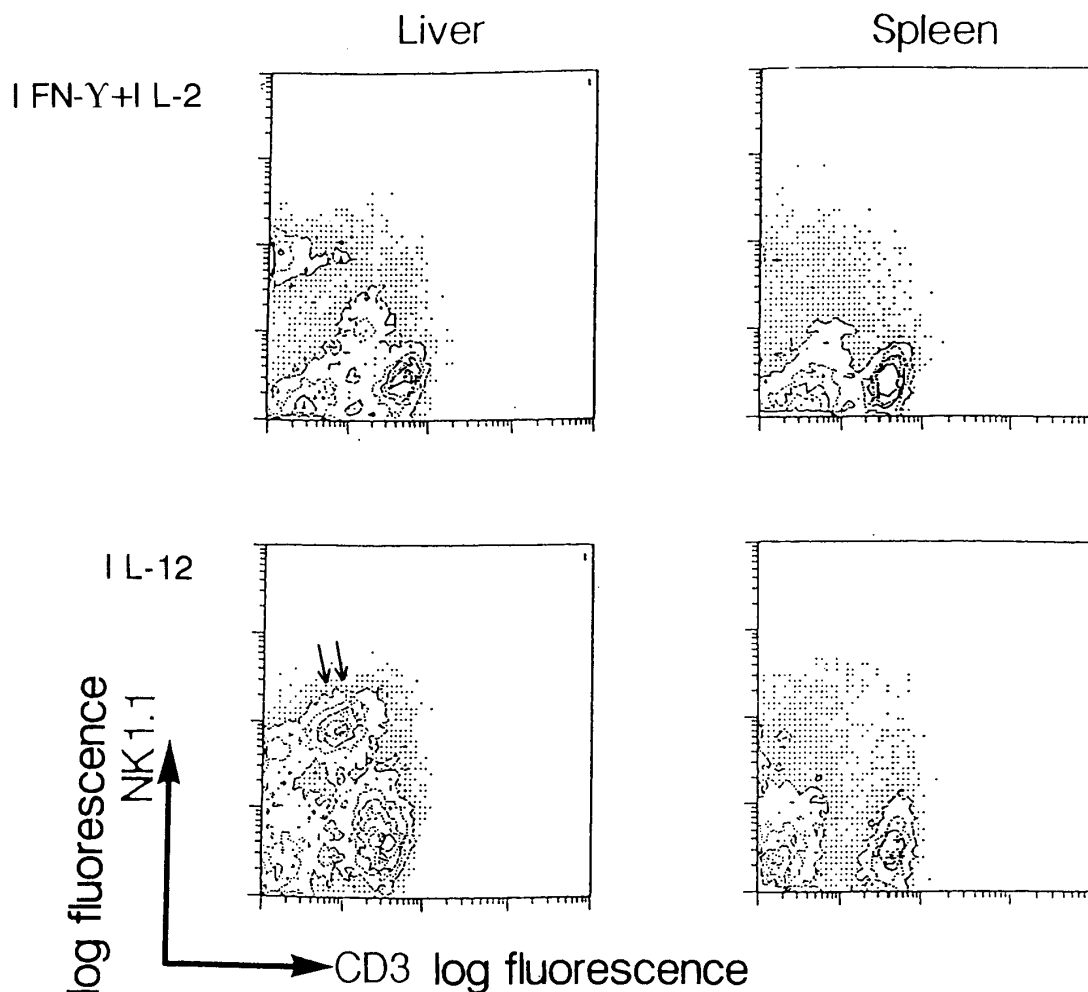


図6 mIL-12投与, mIFN- γ とhIL-2の併用投与による肝臓, 脾臓でのリンパ球の変化
mIL-12を0.5 μ g, mIFN- γ とhIL-2を 1×10^4 Uずつ腹腔内投与後12時間の肝臓, 脾臓の
CD3 (FITC) とNK1.1 (PE) の二重染色のパターン。(↓↓)はCD3^{int} NK1.1^h細胞である。

8. *Porphyromonas*, IL-12投与時の他のマーカーの検討

IL-12により誘導されたCD3^{int}NK1.1^h細胞が, *Porphyromonas*の投与により出現した同マーカーの細胞と同じ細胞であるか否かを確認するために, 他の細胞表面マーカーの発現を検討した。IL-12, *Porphyromonas*それぞれ投与したマウス肝の単核球のCD4, CD8, V β 8の発現を調べた(図8)。結果は, IL-12, *Porphyromonas*投与両群で, それぞれの表面マーカーのパターンは同じであり, CD4 dull positiveの細胞がCD3^{int}NK1.1^h細胞の90%以上であった。CD8 positive細胞は, 同細胞群には認められず, また90%以上がTcR $\alpha\beta$ の β 鎖はV β 8レパートアを持つ細胞群であった。

これらの成績より, *Porphyromonas gingivalis*の投与によって誘導されたCD3^{int}NK1.1^h細胞は, そのLPS刺激によって産生されたIL-12を介して誘導された細胞であることが強く示唆される。また, IL-12は, LPSによって誘導されるTNF- α などの既知のサイトカインを介する機構とは異なった回路で, この様な細胞障害活性細胞を誘導していることが示唆された。

考 察

IL-12 (NKSF)はKobayashiら¹¹⁾やGatelyら¹²⁾が別個に見出したサイトカインであり, 種々の作用が報告されているが, 最も特徴的な作用は, リンパ球からのIFN- γ の産生を誘導し, NK活性を増強することである¹³⁻¹⁷⁾。しかし, 今回の実験結果はIFN- γ によ

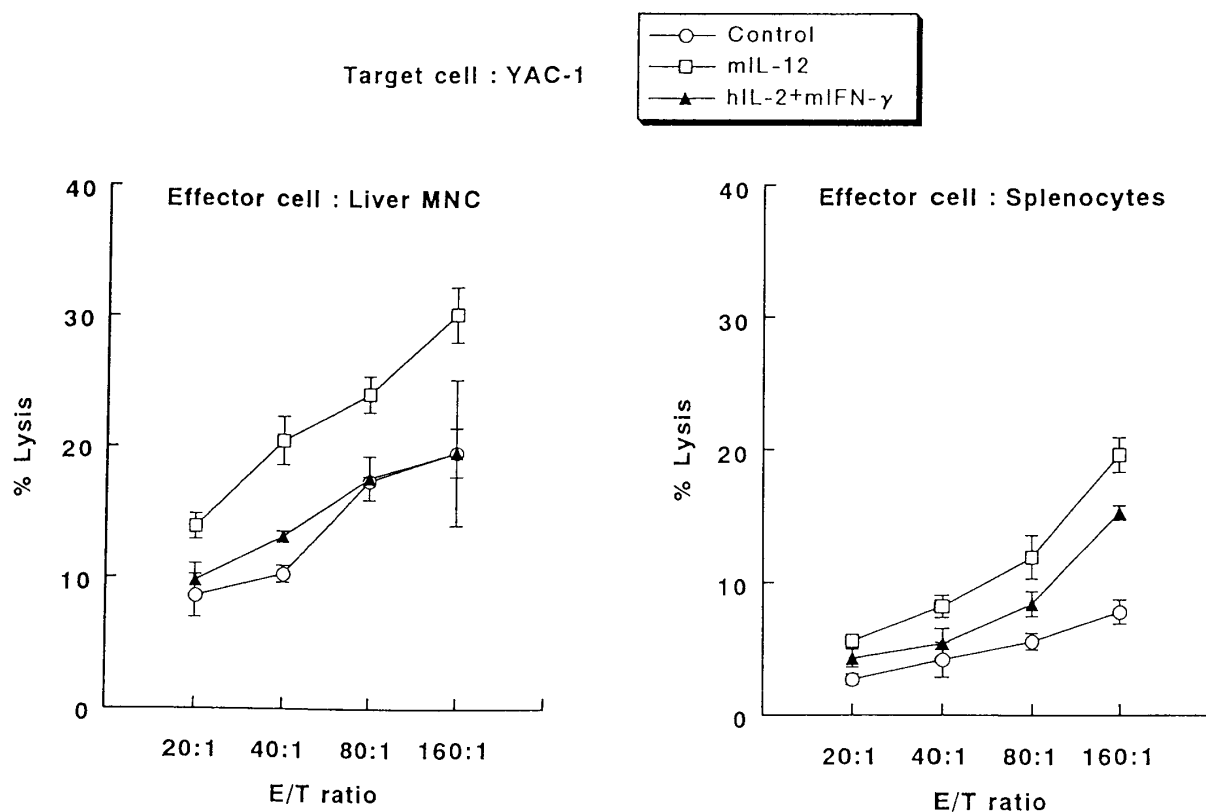


図7 mIL-12 投与, mIFN- γ と hIL-2 の併用投与での肝臓, 脾臓での細胞障害活性試験
 mIL-12 を 0.5 μ g, mIFN- γ と hIL-2 を 1×10^4 U ずつ腹腔内投与後 12 時間の肝臓, 脾臓の細胞障害活性試験。YAC-1 細胞を標的細胞として用い, 4 時間の ^{51}Cr 遊離法にて障害活性を測定した。

る作用とは異なった IL-12 による NK 活性の増強を示唆した。今回観察された $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞の出現に伴う細胞障害活性の増強は, これまで細胞障害活性の増強作用を有するとされてきた, 他のいかなるサイトカインにもなく, IL-12 の最も大きな特徴といえることができる。また, IL-12 の responder cell となる $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞の前駆細胞に関しては, T_{NK} 細胞と $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞の細胞表面マーカーからみると, 両者とも同じ CD4^+ , CD8^- , TcR^+ (Intermediate) である点¹⁸⁾, また $\text{V}\beta 8$ の使用頻度が非常に高い¹⁹⁾ という共通点から $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞の前駆細胞は T_{NK} 細胞であり, その活性化により NK1.1 の発現を高めたものと考えられる。

T_{NK} 細胞は, 胸線^{18,19)}, 脾臓^{20,21)}, 骨髄²⁰⁾ でその存在が報告されている。しかし, それらの臓器内での分布が少ないにもかかわらず, 肝において高い割合で存在するこの非常に興味深い。この T_{NK} 細胞は, ヌードマウスや, 胸腺摘出マウスにも存在し, 胸腺外で分化する T 細胞とされている²¹⁻²⁴⁾。 T_{NK} 細胞は, 細菌感染

時²⁴⁾での増加が見られることから, 異物排除能を発揮し, 生体防御に重要な役割をはたしていると考えられている。正常個体より分離した新鮮 T_{NK} 細胞は YAC-1 に対する細胞障害活性も低く¹⁹⁾, 移植骨髄細胞の拒絶²¹⁾ や自己免疫疾患の発症抑制に働いている²⁵⁾ という報告はあるが IL-12 と関連した報告はみられない。今回得られた結果, すなわち IL-12 を作用されることにより, T_{NK} 細胞が高い細胞障害活性を得ることは, T_{NK} 細胞が実際に, 生体防御に機動しており, その防御系には IL-12 が大きく関与していることを示唆するものと考えられる。

マウスの癌転移実験モデルにおいて, IL-12 の投与は肺転移, 肝転移の両実験系で IL-12, IFN- γ 投与に比べ著明な抑制効果を示しており²⁶⁾, また, その時肝臓や末梢血中に $\text{CD3}^{\text{int}}\text{NK1.1}^{\text{H}}$ 細胞の存在が報告されており²⁷⁾, 前述の考えを支持するものと思われる。

IL-12 の働きには, *Leishmania major* などの原虫²⁸⁾ や細胞内寄生性細菌である *Listeria* の感染症での防御的作用⁹⁾ も知られており, これらのマウス感染系にマ

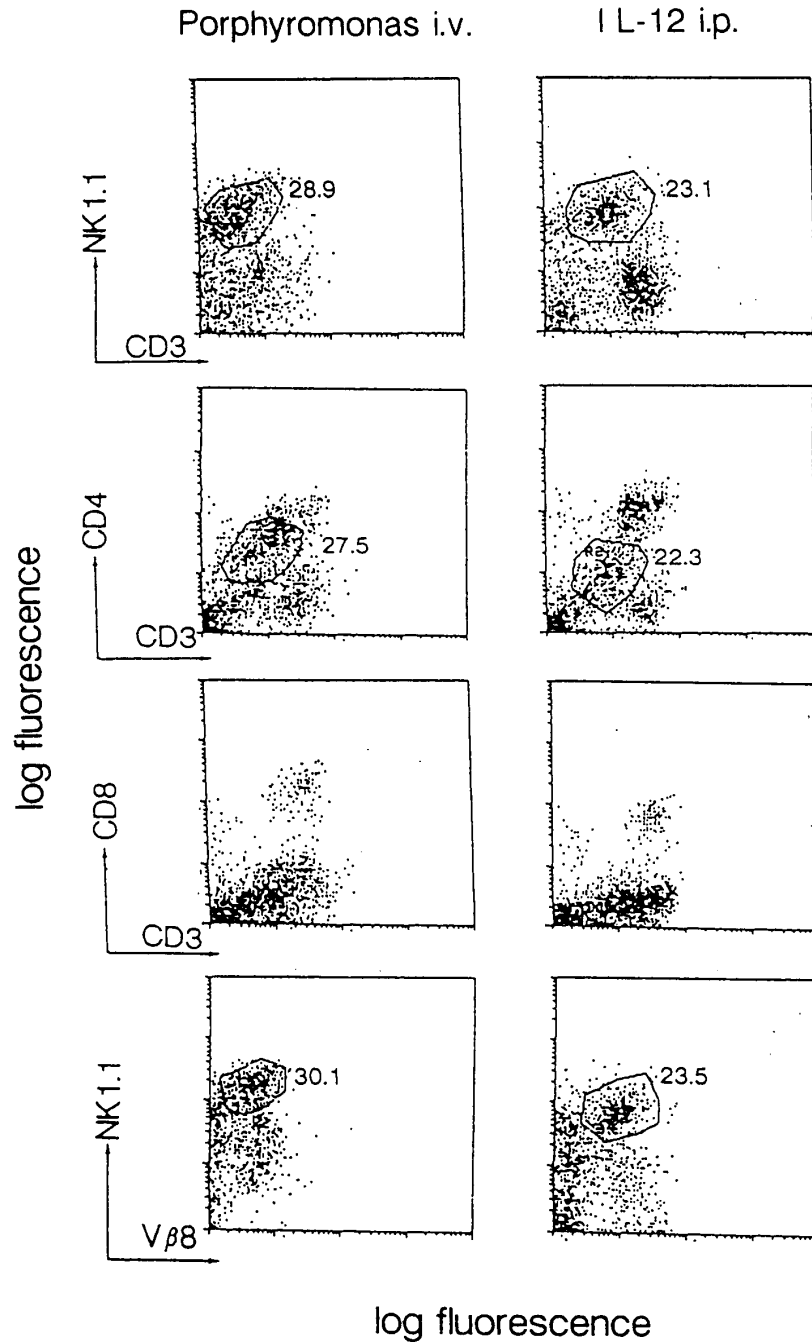


図8 *Porphyromonas gingivalis* 菌体成分投与と mIL-12 投与での肝臓のリンパ球マーカー
Porphyromonas gingivalis 菌体成分を 100 μ l 静脈内投与, mIL-12 を 0.5 μ g 腹腔内投与後 12 時間の肝臓の CD3 (FITC), NK1.1 (PE), CD4 (PE), CD8 (PE), V β 8 (FITC) の二重染色のパターン。枠で囲んだ部分は CD3^{int} NK1.1⁺ 細胞に相当する細胞群, 数字は全細胞に占める割合 (%)。

ウスのレコンビナント IL-12 を投与すると, いずれの系でも劇的な防御効果がもたらされている。今回投与したグラム陰性菌や LPS による T_{NK} 細胞の活性化は, T_{NK} 細胞がグラム陰性菌感染の場合にも生体防御

の役割をたしていることをうかがわせるものである。このことは, グラム陰性菌である *E. coli* が腸管の損傷等により侵入した場合, その影響を最も早く受けると考えられる肝に T_{NK} 細胞が多く存在していることと

一致する。

今回の実験で、グラム陰性菌感染モデルとして菌体成分を投与することにより発現した CD3^{int}NK1.1^h 細胞はグラム陰性菌の細胞壁構成の一因子である LPS の投与によっても発現し、LPS による産生誘導の報告もされている³⁰⁾ IL-12 の投与によっても、発現した。このことから、IL-12 以外の因子の関与は否定できないが、現在知られている他のサイトカインに CD3^{int}NK1.1^h 細胞の誘導活性が認められないことから考えて *Porphyromonas gingivalis* や *E. coli* によって誘導されたこれらの細胞は IL-12 によって誘導されたものであると考えることができる。また、NK 細胞が細菌感染に防御的に働いており^{7,31-33)}、歯周組織での抗菌的作用も報告されている⁸⁾ ことから、CD3^{int}NK1.1^h 細胞が口腔内グラム陰性菌由来の LPS により誘導され、口腔領域でも感染防御に働いている可能性が強く示唆される。

略語表

CD3^{int}NK1.1^h: CD3 intermediate intensity, NK1.1

high bright intensity

FACS: fluorescence activated cell sorter

FITC: Fluorescein isothiocyanate

IFN- γ : Interferon- γ

IL-2: Interleukin-2

IL-12: Interleukin-12

LPS: Lipopolysaccharide

PBMC: peripheral blood mononuclear cells

PE: Phycoerythrin

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と、御校閲を賜りました本学口腔細菌学講座恩師 熊谷勝男教授ならびに口腔解剖学第二講座 加賀山学教授、歯科保存学第一講座 堀内博教授に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり終始御教示御指導および御協力いただきました本学口腔細菌学講座教室員各位にあわせて厚く感謝いたします。

内容要旨: 口腔内常在菌の中で、歯周病原性の高いグラム陰性桿菌の免疫系に対する影響を検討する目的で、マウスに *Porphyromonas gingivalis* の菌体成分を投与したところ、肝において新しいリンパ球分画の誘導が発見された。この細胞は、NK 細胞のマーカーの NK1.1 の発現が通常の NK 細胞より高く (high)、T 細胞マーカーの CD3 が中等度 (intermediate) に発現しているという特徴 (CD3^{int}NK1.1^h) を有する。この CD3^{int}NK1.1^h 細胞は、*E. coli* 菌体成分や、その LPS 成分の投与によっても同じく肝に強く誘導された。これらの細胞は非常に強い細胞障害活性 (NK 活性) を示し、その誘導機構を追求したところ、LPS によって産生が誘導される IL-12 の投与で肝に誘導されることがわかった。*P. gingivalis* や *E. coli* 菌体成分および LPS で誘導される細胞群も、IL-12 で誘導される細胞群も、全て、CD3^{int}NK1.1^h の形質をもち、CD4 弱陽性、V β 8 陽性で細胞障害活性の強いリンパ球であることがわかった。そして、この細胞群の前駆細胞は、今日知られている NK 細胞と T 細胞の両形質をもつ T_{NK} 細胞と考えられ、所謂、胸腺外分化 T 細胞の活性型であることが示唆された。

文 献

- 1) 瀧川富男: 口腔領域の炎症. 上野 正, 伊藤秀夫 編: 最新口腔外科学. 医歯薬出版, 東京, 1987 年, pp. 100-108.
- 2) Darwish, S., Hyppa, T. and Socransky, S.S.: Studies of the predominant cultivable microbiota of early periodontitis. J. Periodont. Res. **13**: 1-16, 1978.
- 3) Hofstad, T.: Biological activities of endotoxin from *Bacteroides melaninogenicus*. Arch. Oral Biol. **15**: 343-348, 1970.
- 4) Lindemann, R.A., Economou, J.S. and Rothermel, H.: Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human periodontal monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J. Dent. Res. **67**: 1131-1135, 1988.
- 5) Hausmann, E., Raisz, L.G. and Miller, W.A.: Endotoxin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. Science **168**: 862-864, 1970.
- 6) Wynne, S.E., Walsh, L.J., Seymour, G.J. and

- Powell, R.N.: *In situ* demonstration of natural killer (NK) cells in human gingival tissue. *J. Periodontol.* **57**: 699-702, 1986.
- 7) Østensen, M.E., Thiele, D.L. and Lipsky, P.E.: Tumor necrosis factor- α enhances cytotoxic activity of human natural killer cells. *J. Immunol.* **138**: 4185-4191, 1987.
 - 8) Lindemann, R.A., Miyasaki, K.T. and Wolinsky, L.E.: Induction of activated lymphocyte killing by bacteria associated with periodontal disease. *J. Dent. Res.* **67**: 846-850, 1988.
 - 9) Lindemann, R.A. and Eilver, F.: Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Oral Biol.* **34**: 459-463, 1989.
 - 10) Lindenmann, R.A.: The regulatory effects of monocytes on human natural killer cells activated by lipopolysaccharides. *J. Periodont. Res* **26**: 486-490, 1991.
 - 11) Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B. and Trinchieri, G.: Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 827-845, 1989.
 - 12) Gately, M.K., Desai, B.B., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Podlaski, F.J., Familletti, P.C., Sinigaglia, F., Chizzonite, R., Gubler, U. and Stern, A.S.: Regulation of lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor). *J. Immunol.* **147**: 874-882, 1991.
 - 13) Wolf, S.F., Temple, P.A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzalo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R.M., Kelleher, K., Herrmann, S.H., Clark, S.C., Azzoni, L., Chan, S.H., Trinchieri, G. and Perussia, B.: Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* **146**: 3074-3081, 1991.
 - 14) D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N.M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S.H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., Chizzonite, R., Wolf, S.F. and Trinchieri, G.: Production of natural killer cell stimulatory factor (Interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* **176**: 1398-1848, 1992.
 - 15) Cesano, A., Visonneau, S., Clark, S.C. and Santolo, D.: Cellular and molecular mechanisms of activation of MHC nonrestricted cytotoxic cells by IL-12. *J. Immunol.* **151**: 2493-2957, 1993.
 - 16) Schenhaut, D.S., Chua, A.O., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., Maccomas, W., Familletti, P.C., Gately, M.K. and Gubler, U.: Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol.* **148**: 3433-3440, 1992.
 - 17) Locksley, R.M.: Interleukin 12 in host defense against microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5879-5880, 1993.
 - 18) Levitsky, H.I., Golumbek, P.T. and Pardoll, D. M.: The fate of CD-48⁻ T cell receptor- $\alpha\beta$ ⁺ thymocytes. *J. Immunol.* **146**: 1113-1117, 1991.
 - 19) Ballas, Z.K. and Rasmussen, W.: NK1.1⁺ thymocytes adult murine CD4⁻, CN8⁻ thymocytes contain an NK1.1⁺, CD3⁺, CD5^{hi}, CD44^{hi}, TCR-V β 8⁺ subset. *J. Immunol.* **145**: 1039-1045, 1990.
 - 20) Sykes, M.: Unusual T cell populations in adult murine bone marrow prevalence of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ and $\alpha\beta$ TCR⁺NK1.1⁺ cells. *J. Immunol.* **145**: 3209-3215, 1990.
 - 21) Kikly, K. and Dennert, G.: Evidence for extrathymic development of TNK cells NK1⁺ CD3⁺ cells responsible for acute marrow graft rejection are present in thymusdeficient mice. *J. Immunol.* **149**: 403-412, 1992.
 - 22) Seki, S., Abo, T., Ohteki, T., Sugiura, K. and Kumagai, K.: Unusual $\alpha\beta$ -T cells expanded in autoimmune *lpr* mice are probably a counterpart of normal T cells in the liver. *J. Immunol.* **147**: 1214-1221, 1991.
 - 23) Ohteki, T., Okuyama, R., Seki, S., Abo, T., Sugiura, K., Kusumi, A., Ohmori, T., Watanabe, H. and Kumagai, K.: Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice. *J. Immunol.* **149**: 1562-1570, 1992.
 - 24) Abo, T., Kusumi, A., Seki, S., Ohteki, T., Sugiura, K., Masuda, T., Rikiishi, H., Iiai, T.

- and Kumagai, K.: Activation of extrathymic T cells in the liver and reciprocal inactivation of intrathymic T cells by bacterial stimulation. *Cell. Immunol.* **142**: 125-136, 1992.
- 25) Takeda, K. and Dennert, G.: The development of autoimmunity in C57BL/6*lpr* mice correlates with the disappearance of natural killer type1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J. Exp. Med.* **177**: 155-164, 1993.
- 26) 安西良一, 杉浦慶太郎, 橋元 亘, 崎原 浩, 小笠原康悦, 下田 明, 竹田和由, 力石秀実, 熊谷勝男: マウス腫瘍 RL ♂ 1 の実験的転移に対する mIL-12 の投与効果. 日本免疫学会総会・学術集会記録 **23**: 167, 1993.
- 27) 杉浦慶太郎, 安西良一, 橋元 亘, 山口正明, 下田明, 竹田和由, 力石秀実, 熊谷勝男: mIL-12 の in vivo 投与によるリンパ系細胞への影響. 日本免疫学会総会・学術集会記録 **23**: 167, 1993.
- 28) Heinzl, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E. and Gately, M.K.: Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* **177**: 1505-1509, 1993.
- 29) Hsieh, C-S., Macatonia, S.E., Tripp, C.S., Wolf, S.F., O'Garra, A. and Murphy, M.: Development of Th1CD4⁺T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**: 547-548, 1993.
- 30) Mengel, J., Dare, L., Dare, G.M., Delgado, M., Nomizo, A., Silva, J.S. and Campos, N.A.: An activated murine B cell lymphoma line (A-20) product a factor-like activity which is functionally related to human natural killer cell stimulatory factor. *Eur. J. Immunol.* **22**: 3173-3178, 1992.
- 31) Lowell, G.H., Macdermott, R.P., Summers, P.L., Reeder, A.A., Bertovich, M.J. and Formal, S.B.: Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity: K lymphocytes, monocytes, and granulocytes are effective against *Shigella*. *J. Immunol.* **125**: 2778-2784, 1980.
- 32) Nencioni, L., Villa, L., Boraschi, D., Berti, B. and Tagliabue, A.: Natural and antibody-dependent cell-mediated activity against *Salmonella typhimurium* by peripheral and intestinal lymphoid cells in mice. *J. Immunol.* **130**: 903-907, 1983.
- 33) Lindemann, R.A.: Bacterial activation of human natural killer cells: role of cell surface lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **56**: 1301-1308, 1988.